

## **HISTOLOGI, EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI KOLAGEN GELEMBUNG RENANG IKAN CUNANG *Muarenesox talabon***

### ***THE HISTOLOGICAL, EXTRACTION AND CHARACTERIZATION COLLAGENS YELLOW-PIKE CONGER Muarenesox talabon***

**Dewi Setiyowati Gadi\*, Wini Trilaksani, dan Tati Nurhayati**

Departemen Teknologi Hasil Perairan, FPIK-IPB, Bogor

\*E-mail: dewisetiyowati44@gmail.com

#### **ABSTRACT**

*By product Muarenesox talabon swim bladders can be used as a raw material for desperately needed in the food, biomedical, pharmaceutical, and cosmeceuticals industries. The aims of the research were to observed the histological and determine chemical characteristics of swim bladder including proximate and amino acids; extraction of acid soluble collagen and determine the characteristics of collagen including proximate, pH, heavy metals, microbial, amino acids, functional groups, molecular weights, and thermal stability. The morphology of cunang swim bladder consists of outer, middle, and inner layers containing collagen fibers;  $33.67 \pm 0.71\%$  wb and protein which were dominated by three amino acids that were glycine, proline, and alanine. Pretreatment by 0.1 M NaOH for 8 hours (KIT4) and acid extraction by 0.25 M acetic acid for 72 hours (MIT3) was the best treatment yielding  $14.51 \pm 0.43\%$  of collagen; having  $12.12 \pm 0.04\%$  wb of moisture;  $88.54 \pm 0.08\%$  wb of protein;  $1.31 \pm 0.23\%$  wb of fat;  $0.17 \pm 0.03\%$  wb of ash. Not detected any heavy metals (Pb, Hg, As, Cd). Acidity pH was 4.31 and negative of *E. coli* and *Salmonella*. The main amino acids detected were glycine 241.06 mg/g; proline 88.73 mg/g; and alanine 86.98 mg/g; FTIR spectra were revealed the presence of triple helix structures; electrophoresis patterns consisted of 136 kDa of mol weight of  $\alpha 1$  and 117 kDa of mol weight of  $\alpha 2$  were characterised to be type I collagen; which had  $T_{max}$  of 195.59°C and  $\Delta H$  7.8113 J/g.*

**Keywords:** acid extraction, swim bladder, collagens, thermal stability

#### **ABSTRAK**

Limbah gelembung renang *Muarenesox talabon* dapat digunakan sebagai bahan baku kolagen yang sangat dibutuhkan pada industri makanan, biomedis, farmaseutikal, dan kosmeutikal. Tujuan penelitian adalah untuk mengamati histologi dan menentukan karakteristik kimia gelembung renang meliputi proksimat dan asam amino; ekstraksi kolagen larut asam dan menentukan karakteristik kolagen meliputi proksimat, pH, logam berat, mikroba, asam amino, gugus fungsi, bobot molekul, dan stabilitas termal. Morfologi gelembung renang ikan cunang terdiri dari lapisan luar, tengah dan dalam yang mengandung serabut-serabut kolagen; protein  $33,67 \pm 0,71\%$  bb yang didominasi oleh tiga asam amino yaitu, glisina, prolina, dan alanina. Pra perlakuan dengan NaOH 0,1 Molar selama 8 jam (KIT4) dan ekstraksi asam pada konsentrasi 0,25 Molar selama 72 jam (MIT3) adalah perlakuan terbaik menghasilkan rendemen kolagen  $14,51 \pm 0,43\%$ ; kadar air  $12,12 \pm 0,04\%$  bb; protein  $88,54 \pm 0,08\%$  bb; lemak  $1,31 \pm 0,23\%$  bb; abu  $0,17 \pm 0,03\%$  bb; tidak terdeteksi logam berat (Pb, Hg, As, Cd); pH 4,31; negatif cemaran *E. coli* dan *Salmonella*. Asam amino utama adalah glisina 241,06 mg/g; prolina 88,73 mg/g; dan alanina 86,98 mg/g; spektrum FTIR yang mengungkapkan adanya struktur *triple helix*; pola elektroforesis terdiri dari 136 kDa ( $\alpha 1$ ) dan 117 kDa ( $\alpha 2$ ) yang mencirikan kolagen tipe I; serta memiliki  $T_{max}$  195,59°C dan  $\Delta H$  7,8113 J/g.

**Kata kunci:** ekstraksi asam, gelembung renang ikan, kolagen, kestabilan termal

## I. PENDAHULUAN

Potensi sumber daya perikanan tangkap Indonesia tahun 2014 mengalami pertumbuhan sebesar 6.50 juta ton dibandingkan tahun 2013 sebesar 6.04 juta ton (KKP, 2015). Dinas Kelautan dan Perikanan Kabupaten Indramayu melaporkan bahwa potensi produksi ikan cunang *Muarenesox talabon* sebesar 1607.6 ton (tahun 2011), 1334.5 ton (tahun 2012), dan 1062.4 ton (tahun 2013). Pemanfaatan ikan cunang terdiri dari bagian daging dan kulitnya digunakan sebagai bahan baku pembuatan *nugget*, ikan kaleng dan kerupuk, sedangkan bagian jeroan termasuk gelembung renang yang proporsinya sebesar 2% dari berat total ikan cunang belum dimanfaatkan secara baik. Menurut informasi yang diperoleh bahwa beberapa masyarakat di Kabupaten Indramayu memanfaatkan gelembung renang ikan cunang dengan cara pengeringan matahari untuk dijual.

Pemanfaatan gelembung renang ikan di Indonesia sudah mulai dilakukan sejak tahun 2006, yaitu pemanfaatan gelembung renang ikan patin sebagai *edible film* (Riyanto, 2006; Trilaksani *et al.*, 2006) dan sebagai kolagen (Djailani *et al.*, 2016; Kartika dan Trilaksani, 2016). Beberapa keunggulan dari gelembung renang ikan sebagai sediaan kolagen, yaitu ketersediaannya cukup melimpah sebagai limbah dari industri pengolahan ikan dengan kandungan protein cukup tinggi. Kandungan protein dari beberapa jenis gelembung renang ikan yang sudah diteliti, seperti gelembung renang ikan patin setelah dikeringkan adalah 76,75% bk (Riyanto, 2006); ikan tuna sirip kuning *Thunnus albacares* yaitu 72,53% bk (Kaewdang *et al.*, 2014) dan juga ikan cunang *Muarenesox talabon* yaitu 93,39% bk (Kartika dan Trilaksani, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa gelembung renang ikan memiliki komponen kolagen. Limbah yang dihasilkan pada saat pengolahan ikan (tulang, sisik, kulit dan jeroan) dapat mencapai 20-60% dari total bahan baku. Proporsi

gelembung renang ikan yaitu 2% dari satu ekor ikan dengan kandungan kolagen yang tinggi (Riyanto, 2006; Trilaksani *et al.*, 2006; Kartika dan Trilaksani, 2016).

Penelitian-penelitian tentang ekstraksi kolagen dari sumber yang aman mulai berkembang, di antaranya ekstraksi kolagen dari limbah hasil perairan mulai berkembang, dari kulit, tulang, sisik, dan gelembung renang (Nagai dan Zuzuki, 2000). Metode ekstraksi kolagen juga menerapkan metode ekstraksi kolagen yang digunakan pada mamalia dan unggas, di antaranya ekstraksi kolagen larut asam (*acid solubilized collagen/ASC*) dan ekstraksi kolagen larut enzim pepsin (*pepsin soluble collagen/PSC*) atau enzim papain. Karakteristik kolagen yang diisolasi dari hasil perairan merupakan kolagen tipe I dan memiliki bobot molekul yang lebih kecil dibandingkan dengan kolagen yang berasal dari mamalia (Liu *et al.*, 2012; Sinthusamran *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Kaewdang *et al.*, 2015; Djailani *et al.*, 2016; Kartika dan Trilaksani, 2016). Rendemen kolagen larut asam (ASC) dari gelembung renang ikan telah diidentifikasi, di antaranya gelembung renang ikan mas *Hypophthalmichthys nobilis* 14,6% bk (Liu *et al.*, 2012); ikan kakap putih (*Lates calcarifer*) 85,3% bk (Sinthusamran *et al.*, 2013), ikan *yellow fin* tuna *Thunnus albacares* 1,07% bk (Kaewdang *et al.*, 2015); ikan cunang *Muarenesox talabon* 10,29% bk (Kartika dan Trilaksani, 2016). Metode ekstraksi kolagen larut asam (ASC) juga diterapkan pada kulit ikan, di antaranya kulit ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus*) menggunakan asam asetat 0,75 M dan waktu ekstraksi 16 jam yang menghasilkan rendemen 5,96% (Putra *et al.*, 2013); kulit ikan kakap putih (*Lates calcarifer*) 15,8% bk dan rendemen kolagen dari ekstraksi menggunakan enzim pepsin (43,6% bk) dan papain (44,0% bk) lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan asam (Jamilah *et al.*, 2013). Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan spesies, habitat dan proses ekstraksi kolagen juga berpengaruh terhadap rendemen, karakter-

istik fisik, kimia dan mikrobiologi kolagen yang dihasilkan.

Kolagen ( $C_{102}H_{149}N_{31}O_{38}$ ) merupakan protein *fibrilar*, terdiri dari tiga rantai polipeptida (*triple helix*) sebagai komponen utama penyusun kulit dan tulang yang mewakili sekitar 25% dari total berat kering mamalia dan sangat dibutuhkan pada industri makanan, kosmetik, biomedis dan farmasi (Ogawa *et al.*, 2004). Menurut Liu *et al.* (2015), produksi kolagen komersial biasanya bersumber dari kulit dan tulang sapi, babi serta unggas. Hal ini menimbulkan beberapa isu penggunaan yang kurang tepat, seperti kontaminasi biologis yang dapat menimbulkan beberapa jenis penyakit, seperti *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), *transmissible spongiform encephalopathy* (TSE), *foot and mouth disease* (FMD), dan infeksi cacing pita sehingga mendapat reaksi negatif dari konsumen yang sadar akan pentingnya kesehatan.

Menurut Regenstein *et al.* (2003) bahwa masalah budaya dan kepercayaan juga menjadi pertimbangan utama dalam menggunakan kolagen yang bersumber dari sapi dan babi. Oleh karena itu, sangat dibutuhkan sumber alternatif bahan baku lainnya sebagai penghasil kolagen.

Kolagen dari hasil perairan dapat menjadi alternatif yang perlu dikembangkan untuk menghindari penggunaan kolagen dari mamalia dan unggas karena alasan kesehatan dan kehalalan. Salah satunya adalah gelembung renang ikan cunang *M. talabon* yang potensinya cukup banyak di Kabupaten Indramayu. Gelembung renang ikan cunang memiliki kandungan protein 96,16% bk (Djailani *et al.*, 2016) yang didalamnya terdapat kolagen. Penelitian ini perlu dilakukan sebagai salah satu upaya pemanfaatan limbah hasil perairan, sehingga dapat meningkatkan nilai tambah dari gelembung renang ikan, disamping itu untuk memperoleh informasi tentang gambaran dari morfologi gelembung renang ikan cunang *M. talabon* dan karakteristik kolagen larut asam (ASC) yang sesuai dengan syarat mutu.

## II. METODE PENELITIAN

### 2.1. Waktu Penelitian dan Lokasi Pengambilan Sampel

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Februari sampai Juni 2016 di Laboratorium Biokimia Hasil Perairan, FPIK-IPB, Laboratorium Bahan Baku Hasil Perairan Teknologi Hasil Perairan, FPIK-IPB, Laboratorium Pendidikan dan Diagnostik FKH-IPB, Laboratorium Bioteknologi Pusat Antar Universitas-IPB, Laboratorium Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan IPB, Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka IPB, dan Laboratorium Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia.

### 2.2. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dalam dua tahap, yaitu: preparasi dan karakterisasi bahan baku gelembung renang ikan cunang, dan pra perlakuan, optimasi ekstraksi dan karakterisasi fisik, kimia dan mikrobiologi kolagen larut asam (ASC).

#### 2.2.1. Preparasi, Karakterisasi dan Histologi Gelembung Renang Ikan Cunang

Preparasi dan karakterisasi gelembung renang ikan cunang, meliputi pencucian dengan akuades dan pengecilan ukuran  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  menggunakan gunting dengan tujuan untuk mempermudah dalam tahapan pra perlakuan dan ekstraksi. Gelembung renang ikan cunang juga dipreparasi menjadi preparat histologi melalui tiga tahapan, yaitu fiksasi jaringan dengan larutan *paraformaldehyde* selama 1 minggu dan parafinisasi, pemotongan jaringan serta pewarnaan dengan hematoksin-eosin (HE) dan *casson's trichrome* (CT). Pewarnaan HE bertujuan untuk menampilkan struktur morfologi dan pewarnaan CT untuk mengidentifikasi keberadaan protein kolagen pada organ gelembung renang ikan cunang dengan teknik pewarnaan yang menggunakan dua atau lebih pewarna anionik yang berhubungan dengan *phosphomolybdic* atau asam fosfat. Asam ini

dapat dicampurkan dengan pewarna atau larutan dari reagen yang digunakan dan kolagen diwarnai secara selektif oleh salah satu pewarna. *phosphotungstic acid* dan *orange G* berperan dalam mewarnai sitoplasma dan inti sel (Kiernan, 1990). Histologi merupakan suatu ilmu yang mempelajari struktur dan sifat jaringan secara detail menggunakan mikroskop pada jaringan yang dipotong tipis. Gambaran mikroskopik jaringan gelembung renang ikan cunang diawali dengan pembuatan preparat histologi. Pewarnaan dan pengamatan preparat histologi bertujuan untuk melihat gambaran morfologi organ gelembung renang ikan cunang. Karakterisasi kimia gelembung renang ikan cunang, meliputi analisis proksimat (AOAC, 2005) dan kandungan asam amino (Nollet, 1996).

### 2.2.2. Pra Perlakuan dan Optimasi Ekstraksi Kolagen

Pra perlakuan menggunakan larutan alkali (NaOH) dan ekstraksi kolagen larut asam yaitu menggunakan asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Gelembung renang ikan cunang yang sudah dipreparasi, kemudian ditimbang sebanyak 30 gram dan direndam dalam larutan NaOH konsentrasi 0,1, 0,15 dan 0,2 M selama 12 jam pada suhu  $4^\circ\text{C}$  (rasio 1:10 b/v). Larutan perendaman NaOH diganti setiap dua jam kemudian diukur protein terlarutnya dengan metode Bradford (1976). Sampel dinetralkan dengan akuades untuk menghilangkan residu larutan NaOH (pH 7). Pra ekstraksi gelembung renang ikan cunang terpilih berdasarkan hasil analisis protein terlarut, kemudian dilanjutkan dengan optimasi ekstraksi kolagen larut asam.

Tahapan optimasi ekstraksi atau hidrolisis kolagen larut asam (ASC) menggunakan larutan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dengan konsentrasi 0,25, 0,50 dan 0,75 M selama 24, 48 dan 72 jam pada suhu  $4^\circ\text{C}$  (rasio 1:6 b/v). Filtrat disaring, kemudian dipresipitasi dengan NaCl (2,6 M) terhadap 0,5 M buffer trishidroksi metilaminometana pH 7,5 dan disimpan selama 24 jam pada suhu  $4^\circ\text{C}$ . Presipitat

dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm ( $6.910\times g$ ) selama 1 jam. Pelet dilarutkan ke dalam 0,5 M asam asetat (rasio 1:2 b/v) dan didialisis terhadap 0,1 M asam asetat dan akuades selama 24 jam (rasio 1:10 b/v). Dialisat kemudian diliofilisasi (*freeze dried*) untuk memperoleh kolagen larut asam dalam bentuk kering.

Karakterisasi fisik, kimia dan mikrobiologi kolagen ekstraksi asam, meliputi pengukuran kelarutan, rendemen liofilisasi, gugus fungsi dengan *fourier transform infra red/FTIR* (Belbachir *et al.*, 2009), bobot molekul dengan *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis/SDS-PAGE* (Laemmli, 1970), analisis proksimat (AOAC, 2005), derajat keasaman (pH), logam berat yaitu arsen (As), kadmium (Cd), timbal (Pb) dan merkuri (Hg) (SNI I 01-4866-1998, SNI 01-2354.6-2006, SNI 01-2354.7-2006, SNI 7387-2009), cemaran mikrobiologi yaitu bakteri *Escherichia coli* (SNI 01-2332.1-2006) dan *Salmonella* (SNI 01-2332.2-2006), asam amino dengan *ultra performance liquid chromatography* (UPLC) (Nollet, 1996), stabilitas termal dengan *diffrential scanning calorimetry* (DSC) (Budruga *et al.*, 2010). Tujuan dari karakterisasi fisika, kimia dan mikrobiologi kolagen adalah untuk mengetahui kuantitas dan kualitas kolagen larut asam (ASC) yang dihasilkan.

### 2.3. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap pengamatan berulang (RAL *in time*). Tahap pra perlakuan meliputi pemberian konsentrasi NaOH dengan taraf 0,1; 0,15; dan 0,2 M sebagai faktor utama dan waktu perendaman (2, 4, 6, 8, 10, dan 12 jam) sebagai pengamatan berulang. Respon yang diukur adalah nilai konsentrasi protein terlarut (mg/mL). Tahap optimasi ekstraksi meliputi pemberian konsentrasi asam asetat dengan taraf 0,25, 0,50 dan 0,75 M dengan satuan waktu perendaman 24, 48 dan 72 jam.

Respon yang diamati pada tahap optimasi ekstraksi asam asetat adalah kelarutan (gram) dan persentase rendemen kolagen liofilisasi. Semua perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis menggunakan program SAS 9.3 untuk mengetahui ragam (ANOVA) dan jika terdapat pengaruh nyata pada taraf perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji *duncan multiple range test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

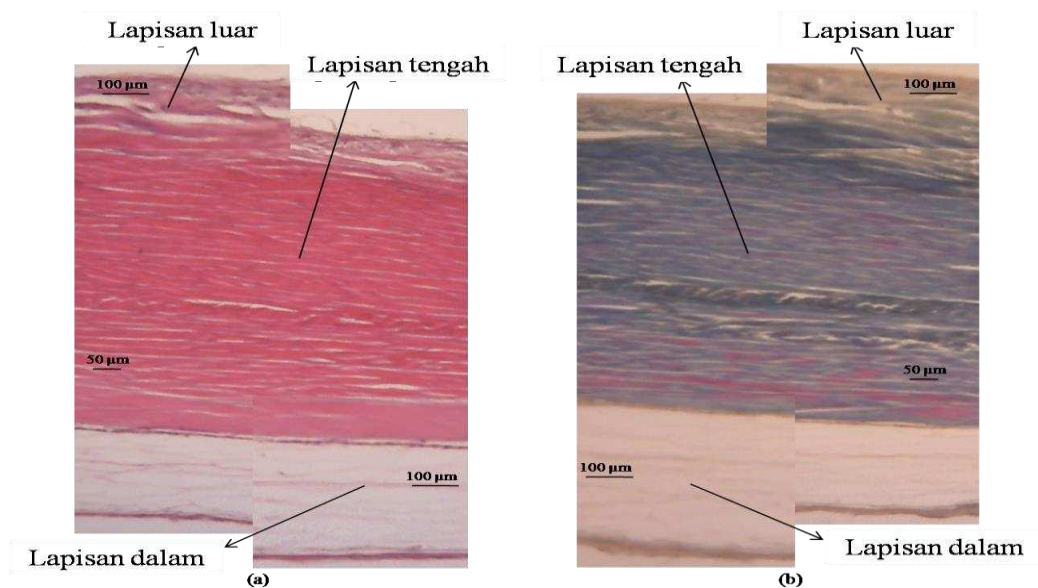
#### 3.1. Karakteristik Gelembung renang Ikan Cunang

##### 3.1.1. Gambaran mikroskopik jaringan

Hasil pengamatan dari mikroskopik jaringan gelembung renang ikan cunang dari pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) disajikan pada Gambar 1(a), menunjukkan bahwa gelembung renang ikan cunang terdiri dari tiga lapisan yaitu lapisan luar, tengah dan dalam, dengan ciri khas masing-masing. Lapisan luar terbentuk seperti lapisan tebal, tersusun atas serabut-serabut halus yang padat. Lapisan tengah memiliki serabut-serabut panjang dan tebal, serta memiliki inti sel yang ditunjukkan dengan warna biru

kecoklatan. Warna merah mendominasi lapisan luar dan tengah, sementara untuk lapisan dalam didominasi oleh warna biru dan memiliki serabut-serabut yang tipis dan panjang.

Gambar 1 (b) menunjukkan jaringan gelembung renang ikan cunang setelah diwarnai dengan *casson's thricrome* (CT). Warna biru berasal dari pewarnaan *aniline blue* yang mempertahankan warnanya setelah dilakukan pencucian dengan alkohol dan penjernihan dengan larutan *xylol*. Warna biru yang tertinggal setelah proses dehidrasi atau pemucatan warna *casson's trichrome* menunjukkan jaringan gelembung renang ikan cunang mengandung protein kolagen. Gambar 1 (b) memperlihatkan warna biru pada hampir seluruh lapisan gelembung renang, baik di lapisan luar, tengah dan dalam. Lapisan dalam memperlihatkan beberapa spot berwarna merah yang menunjukkan jaringan gelembung renang ikan cunang juga memiliki jaringan otot polos. Dominan warna biru pada jaringan gelembung renang ikan cunang mengindikasikan bahwa organ gelembung renang ikan cunang mengandung protein kolagen, sehingga dapat digunakan sebagai sumber bahan baku alternatif penghasil kolagen.



Gambar 1. Visualisasi sayatan melintang gelembung renang ikan cunang, (a) pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) dan (b) *casson's trichrome* (CT).

### 3.1.2. Komposisi Proksimat

Analisis proksimat gelembung renang ikan cunang bertujuan untuk mengetahui kandungan gizi secara kasar (*crude*) dan menjadi acuan untuk menentukan proses pra perlakuan dan ekstraksi kolagen. Karakteristik kimia gelembung renang ikan cunang secara proksimat disajikan pada Tabel 1.

Limbah gelembung renang ikan cunang berpotensi digunakan sebagai bahan baku untuk menghasilkan kolagen karena memiliki kandungan protein cukup tinggi, yaitu  $33,67 \pm 0,71\%$  basis basah (bb) atau  $96,20\%$  basis kering (bk) dibandingkan dengan gelembung renang ikan *yellow fin* tuna *Thunnus albacares* dan gelembung renang ikan patin *Pangasius* sp. (Kaewdang *et al.*, 2014; Riyanto, 2006). Menurut Jonsson and Vidarsson (2016), protein gelembung renang ikan didominasi oleh kolagen. Kolagen ( $C_{102}H_{149}N_{31}O_{38}$ ) adalah salah satu protein yang keberadaannya kurang lebih 30% dari seluruh protein yang terdapat di tubuh dan merupakan struktur organik pembangun tulang, gigi, sendi, otot, dan kulit (Voet *et al.*, 2013).

Gelembung renang ikan cunang hasil penelitian memiliki kadar air  $35,00 \pm 0,64\%$

bk lebih rendah dibandingkan dengan gelembung renang ikan *yellow fin* tuna, patin, dan *bighead carp* (Kaewdang *et al.*, 2014; Riyanto 2006; Liu *et al.* 2012). Kadar air dalam suatu bahan terdiri atas air bebas dan air terikat secara kimia, dan kadar air yang terukur merupakan air bebas dalam bahan baku. Kandungan air juga ikut menentukan kesegaran dan daya tahan suatu bahan. Holma *et al.* (2013) menyatakan bahwa pada umumnya ikan terdiri atas 70 sampai 84% air, 15-24% protein, 0,1 - 22% lemak dan 1-2% mineral. Kadar lemak ( $0,86 \pm 0,49\%$  bk), abu ( $0,49 \pm 0,21\%$  bk) dan karbohidrat ( $2,43 \pm 0,31\%$  bk) berhubungan dengan tahap pra ekstraksi yang akan diterapkan pada proses ekstraksi gelembung renang yang akan memberikan keuntungan di antaranya efektif dan ekonomis dari sisi waktu dan biaya. Tahapan pra ekstraksi yang dimaksud adalah penghilangan komponen protein non kolagen (*deproteinase*), lemak (*defatting*), dan mineral (*demineralisasi*). Komponen proksimat menunjukkan gambaran bahwa gelembung renang ikan cunang sangat berpotensi dimanfaatkan mengingat komponen utamanya berupa protein (kolagen) sebagai sumber kolagen terbarukan dari limbah perairan.

Tabel 1. Komposisi proksimat limbah gelembung renang ikan.

Komposisi Proksimat	Sumber Gelembung Renang Ikan (% Basis Basah)				
	Cunang ( <i>Muarenesox talabon</i> ) <sup>1</sup>	Cunang ( <i>Congresox talabon</i> ) <sup>2</sup>	Cunang ( <i>Muarenesox talabon</i> ) <sup>3</sup>	Tuna ( <i>Thunnus albacares</i> ) <sup>4</sup>	Patin ( <i>Pangasius</i> sp.) <sup>5</sup>
Air	65,00±0,09	58,28±1,21	73,88±0,22	83,33	78,34
Protein	33,67±0,71	40,12±1,25	24,74±0,75	12,09	14,73
Lemak	0,31±0,11	0,43±0,05	0,50±0,05	1,44	0,03
Abu	0,17±0,04	0,47±0,06	0,27±0,03	0,29	0,05
Karbohidrat*	0,85±0,05	0,70±0,06	1,28±0,36	2,85	4,22

Keterangan: <sup>1</sup>Data penelitian, rerata ± SD dari 3 ulangan pada sampel yang sama;

<sup>2</sup>Djailani *et al.* (2016);

<sup>3</sup>Kartika dan Trilaksani (2016);

<sup>4</sup>Kaewdang *et al.* (2014);

<sup>5</sup>Riyanto (2006), dan

\* *by difference*.

### 3.1.3. Komposisi Asam Amino

Kandungan protein pada gelembung renang ikan cunang tersusun atas 17 jenis asam amino yang dianalisis sesuai standar yang ada seperti disajikan pada Tabel 2. Asam-asam amino merupakan kumpulan peptida-peptida yang membentuk suatu ikatan sebagai komponen utama penyusun protein. Berdasarkan strukturnya, asam amino ( $\text{NH}_2$ ) terdiri dari sebuah gugus amino, gugus karboksil ( $\text{COOH}$ ), sebuah atom hidrogen (H), dan gugus radikal (R) yang terikat pada sebuah atom C atau dikenal sebagai karbon  $\alpha$  (Voet *et al.*, 2013). Asam amino glisina, prolina dan hidroksiprolina merupakan asam amino utama pembentuk kolagen yang jarang ditemukan pada protein lain selain pada kolagen dan elastin (Katilli, 2009). Tabel 2 menunjukkan komponen asam amino utama penyusun kolagen dalam gelembung renang ikan cunang yaitu glisina

95,48 mg/g, prolina 40,37 mg/g, dan alanina 42,99 mg/g yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan asam amino gelembung renang ikan cunang dari hasil penelitian Kartika dan Trilaksani (2016) yaitu glisina 56,36 mg/g, prolina 24,48 mg/g, dan alanina 23,21 mg/g. Asam glutamat juga cukup tinggi yaitu 40,34 mg/g yang hampir sama dengan asam amino prolina. Asam amino prolina merupakan asam amino non esensial yang dapat disintesis oleh tubuh manusia dari asam glutamat dengan bantuan prekursor suatu asam imino melalui reaksi kimia dengan bantuan -NADH (Ngili, 2009). Asam amino glisina merupakan asam amino yang paling dominan pada bahan baku yang mengandung kolagen. Menurut Katili (2009), asam amino glisin dapat bergabung dengan lisina dan vitamin C sehingga membentuk jaringan kolagen, sedangkan alanina berfungsi untuk memperkuat membran sel dan membantu metabolisme

Tabel 2. Komponen asam amino gelembung renang ikan cunang (*Muarenesox talabon*).

Jenis Asam Amino	Kadar Asam Amino (mg/g)	
	<i>M. talabon</i> <sup>1</sup>	<i>M. talabon</i> <sup>2</sup>
Glisina ( <i>Gly</i> )	95,98±0,23	56,36
Prolina ( <i>Pro</i> )	40,87±0,81	24,48
Alanina ( <i>Ala</i> )	42,99±0,73	23,21
Asam glutamat ( <i>Glu</i> )	40,34±0,14	20,12
Asam aspartat ( <i>Asp</i> )	23,33±0,34	11,40
Arginina ( <i>Arg</i> )	38,97±0,44	19,27
Valina ( <i>Val</i> )	11,10±0,28	6,05
Isoleusina ( <i>Ile</i> )	5,23±0,12	2,92
Histidina ( <i>His</i> )	4,45±0,83	2,60
Treonina ( <i>Thr</i> )	14,33±0,79	7,24
Tirosina ( <i>Tyr</i> )	2,37±0,50	1,31
Fenilalanina ( <i>Phe</i> )	11,27±0,64	5,12
Serina ( <i>Ser</i> )	12,19±0,57	6,50
Lisina ( <i>Lys</i> )	20,17±0,42	10,41
Leusina ( <i>Leu</i> )	10,87±0,40	6,05
Sisteina ( <i>Cys</i> )	0,12±0,01	0,00
Metionina ( <i>Met</i> )	8,76±0,69	5,25

Keterangan: <sup>1</sup>Data penelitian, <sup>2</sup>Kartika dan Trilaksani (2016).



me glukosa energi tubuh. Alanina, aspartat, glutamat, dan serina dibentuk oleh transaminasi *oksoacid* yang sesuai. Asam amino non-esensial lainnya kemudian diturunkan oleh keempat asam amino ini (Ngili, 2009).

### 3.2. Pra Perlakuan dan Optimasi Ekstraksi Kolagen Larut Asam (ASC)

#### 3.2.1. Pra Perlakuan Gelembung Renang Ikan Cunang

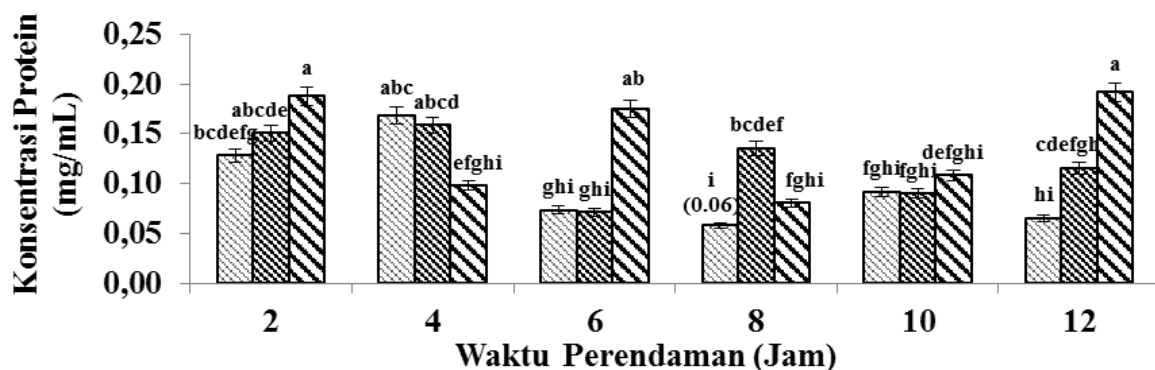
Pra perlakuan sampel gelembung renang ikancunang dilakukan sebelum ekstraksi kolagen untuk mengeliminasi protein non-kolagen, lemak, mineral, pigmen dan pengotor lainnya sehingga memudahkan dalam proses ekstraksi kolagen. Menurut Sinthusarman *et al.* (2013), proses pra perlakuan protein non-kolagen dapat menggunakan larutan alkali seperti natrium hidroksida (NaOH). Larutan NaOH mampu meminimalkan kelarutan protein kolagen dan dapat menyebabkan terjadinya pembengkakan (*swelling*) pada sampel sehingga memungkinkan masuknya air yang mampu memecah sebagian besar daerah telopeptida yang ada di dalam matriks kolagen (Liu *et al.*, 2015; Zhou and Regenstein, 2005). Hasil uji protein terlarut pada larutan perendaman NaOH setiap 2 jam disajikan pada Gambar 2.

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa interaksi antara konsentrasi NaOH

dan waktu perendaman berpengaruh signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar protein terlarut. Tahap pra perlakuan gelembung renang ikan cunang dipilih berdasarkan hasil uji lanjut DMRT yang berbeda nyata yaitu pada interaksi perlakuan konsentrasi larutan NaOH 0,1 M dan lama waktu perendaman 8 jam (K1T4), dikarenakan cukup stabil dan efektif untuk melarutkan protein non-kolagen dibandingkan dengan konsentrasi lainnya (NaOH 0,15 M dan NaOH 0,2). Konsentrasi NaOH yang tinggi dengan waktu perendaman yang lama akan mengakibatkan jumlah protein terlarut semakin meningkat, sehingga yang diduga bukan hanya protein non-kolagen yang terlarut tetapi juga protein kolagen.

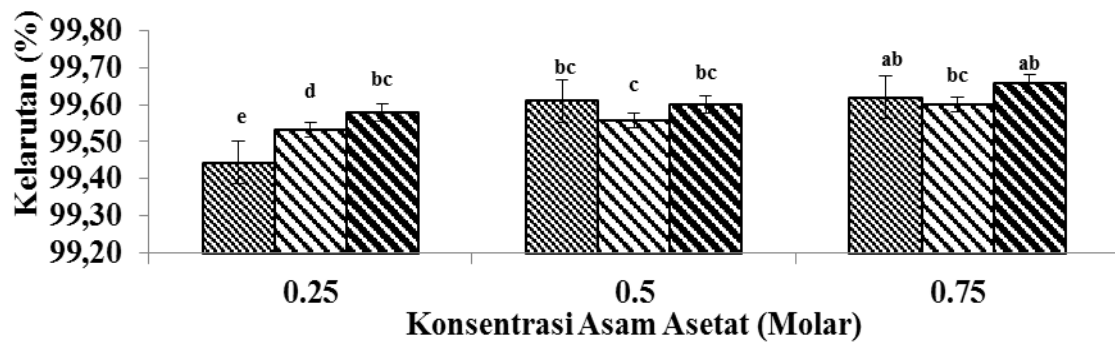
#### 3.2.2. Optimasi Ekstraksi Kolagen Larut Asam (ASC)

Optimasi ekstraksi kolagen larut asam dilakukan setelah mendapatkan konsentrasi dan waktu perendaman larutan NaOH terpilih. Hasil sidik ragam menunjukkan interaksi antara asam asetat dengan lama waktu perendaman (MT) berpengaruh signifikan terhadap kelarutan kolagen ( $p < 0,05$ ) dan uji lanjut DMRT menunjukkan berbeda nyata pada perlakuan konsentrasi asam asetat (M1, M2 dan M3) dan lama waktu perendaman 72 jam (T3).



Gambar 2. Kadar protein terlarut dalam larutan NaOH sisa pra ekstraksi gelembung renang ikan cunang setiap perendaman 2 jam. NaOH 0,1 M (□); NaOH 0,15 M (▨); dan NaOH 0,2 M (▩). Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil perlakuan yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).





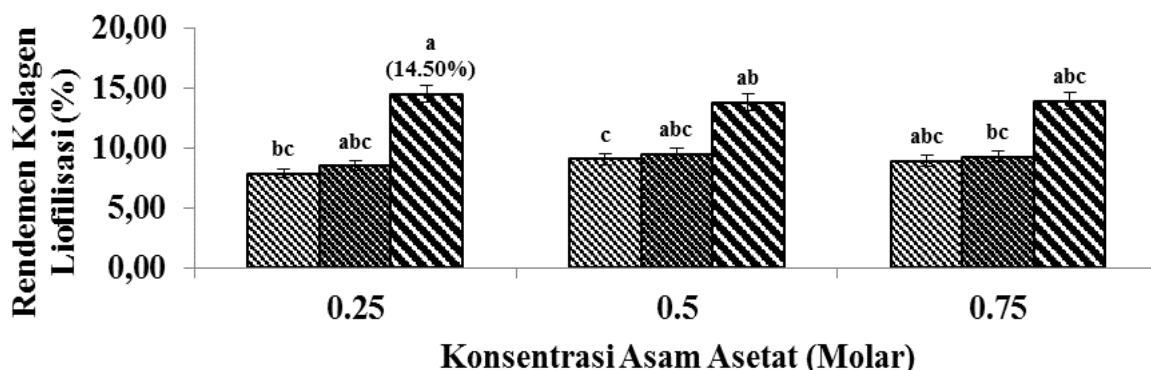
Gambar 3. Persentase kelarutan kolagen gelembung renang ikan cunang dalam asam asetat 0,25 M (M1), 0,50 M (M2) dan 0,75 M (M3). Lama perendaman 24 jam (■), 48 jam (▨) dan 72 jam (▩). Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil perlakuan yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).

Rerata persentase kelarutan kolagen gelembung renang ikan cunang yaitu 99% (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa asam asetat memiliki kemampuan yang baik untuk melarutkan atau melepaskan rantai polipeptida penyusun kolagen yang terdapat dalam matriks menjadi tropokolagen. Asam asetat dipilih sebagai pelarut dalam ekstraksi kolagen karena dapat membantu peningkatan  $H^+$  sehingga mengakibatkan air lebih mudah berpenetrasi ke dalam serat kolagen melalui gaya elektrostatis antara ikatan hidrogen (gugus polar) dan antara atom dengan gugus non-polar (Sinthusamran *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015).

Hasil sidik ragam (ANOVA) rendemen kolagen gelembung renang ikan cunang (liofilisasi) menunjukkan lama waktu

perendaman (T) berpengaruh nyata terhadap kelarutan kolagen gelembung renang ikan cunang ( $p < 0,05$ ). Uji lanjut DMRT menunjukkan perlakuan konsentrasi asam asetat (M1, M2 dan M3) dan lama waktu perendaman 72 jam (T3) berbeda nyata.

Gambar 4 menunjukkan rendemen kolagen meningkat seiring dengan bertambahnya waktu ekstraksi asam asetat. Proses ekstraksi juga dipengaruhi oleh waktu untuk perpindahan molekul suatu zat selama proses difusi (Wang *et al.*, 2008). Proses ekstraksi yang berbeda kemungkinan dapat menghasilkan karakteristik kolagen yang berbeda sesuai dengan kelarutannya (Liu *et al.*, 2015). Perbedaan spesies dan habitat juga sangat mempengaruhi proses pra perlakuan dan ekstraksi.



Gambar 4. Persentase rendemen kolagen liofilisasi gelembung renang ikan cunang. Waktu ekstraksi dengan asam asetat 0,25 M (M1); 0,50 M (M2) dan 0,75 M (M3) selama 24 jam (■), 48 jam (▨) dan 72 jam (▩). Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan hasil perlakuan yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).

Rendemen kolagen yang diperoleh belum cukup menggambarkan bahwa kolagen tersebut merupakan kolagen yang murni. Oleh karena itu, dilakukan analisis terhadap gugus fungsi (Tabel 3), protein terlarut dan bobot molekul (Gambar 5 dan Gambar 6).

### 3.2.3. Gugus Fungsi (*Fourier Transform Infra Red/FTIR*) Kolagen

Kolagen M1T3 merupakan produk terpilih yang diuji FTIR. Karakteristik dari kolagen M1T3 memiliki gugus fungsi dengan puncak serapan amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III yang mengindikasikan struktur-struktur penyusun pada protein kolagen (Tabel 3). Menurut Muyonga *et al.* (2004) bahwa kisaran puncak serapan amida A yaitu 3400-3440  $\text{cm}^{-1}$ , amida B yaitu 2925-2935  $\text{cm}^{-1}$  dan amida I yaitu 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ , amida II berkisar antara 1550-1600  $\text{cm}^{-1}$  (Ahmad and Benjakul, 2010), amida III berkisar antara 1220-1320  $\text{cm}^{-1}$  (Benjakul *et al.*, 2010). Hasil FTIR kolagen larut asam dengan perlakuan konsentrasi asam asetat dan lama waktu perendaman (M1T1, M2T1, M3T1, M1T2, M2T2, M3T2, M1T3, M2T3 dan M3T3) ditunjukkan pada Tabel 3. Kolagen M1T3 merupakan FTIR dari per-

lakukan terpilih yaitu, menunjukkan puncak-puncak serapan yang tersebar pada wilayah amida A, amida B, amida I, amida II, dan amida III.

Keberadaan amida A pada kolagen M1T3 ditunjukkan dengan puncak wilayah serapan pada bilangan gelombang 3441,50  $\text{cm}^{-1}$ . Amida A merupakan gugus khas kolagen dengan puncak wilayah serapan pada bilangan gelombang 3400–3440  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan NH *stretching* (Muyonga *et al.*, 2004). Spektra FTIR kolagen juga menunjukkan puncak wilayah serapan pada bilangan gelombang 2922,53  $\text{cm}^{-1}$  yang tergolong dalam gugus amida B. Coates (2006) menyatakan bahwa serapan amida B ini terbentuk dari asimetrikal *stretching* CH<sub>2</sub> dengan wilayah serapan pada bilangan gelombang antara 2935-2915  $\text{cm}^{-1}$ .

Gugus fungsi amida I pada kolagen M1T3 berada pada puncak wilayah serapan dengan bilangan gelombang 1649,69  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan C=O *stretching*. Hal ini juga ditemukan pada kolagen gelembung renang ikan *T. albacares*, yaitu pada 1648  $\text{cm}^{-1}$  (Kaewdang *et al.*, 2014). Menurut Kong dan Yu (2007) amida I memiliki wilayah serapan pada kisaran 1690-1600  $\text{cm}^{-1}$  yang

Tabel 3. Gugus fungsi (FTIR) kolagen gelembung renang ikan cunang (*M. talabon*).

Kode Sampel	Daerah Serapan Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )				
	Amida A	Amida B	Amida I	Amida II	Amida III
M1T1 <sup>1</sup>	3441,39	2922,00	1649,69	1539,74	1338,85
M1T2 <sup>1</sup>	3560,06	2991,03	1648,68	1523,15	1229,53
M1T3 <sup>1</sup>	3441,50	2922,53	1649,93	1512,96	1316,20
M2T1 <sup>1</sup>	3443,92	2343,33	1646,26	1516,42	1228,01
M2T2 <sup>1</sup>	3445,34	2364,86	1653,65	1541,91	1230,03
M2T3 <sup>1</sup>	3420,36	2120,10	1649,32	1520,33	1232,18
M3T1 <sup>1</sup>	3618,08	2344,63	1645,15	1515,41	1226,20
M3T2 <sup>1</sup>	3617,45	2345,63	1644,77	1515,09	1227,14
M3T3 <sup>1</sup>	3618,08	2344,63	1645,15	1515,41	1228,04
Standar <sup>2</sup>	3300	3100	1600-1690	1480-1575	1229-1301
Standar <sup>3</sup>	3400-3440	2925-2935	1600-1700	1550-1600	1220-1320
Standar <sup>4</sup>	3303	2920	1648	1549	1454

Keterangan: <sup>1</sup>Data penelitian; <sup>2</sup>Kong dan Yu (2007); <sup>3</sup>Muyonga *et al.* (2004); <sup>4</sup>Kaewdang *et al.* (2014).

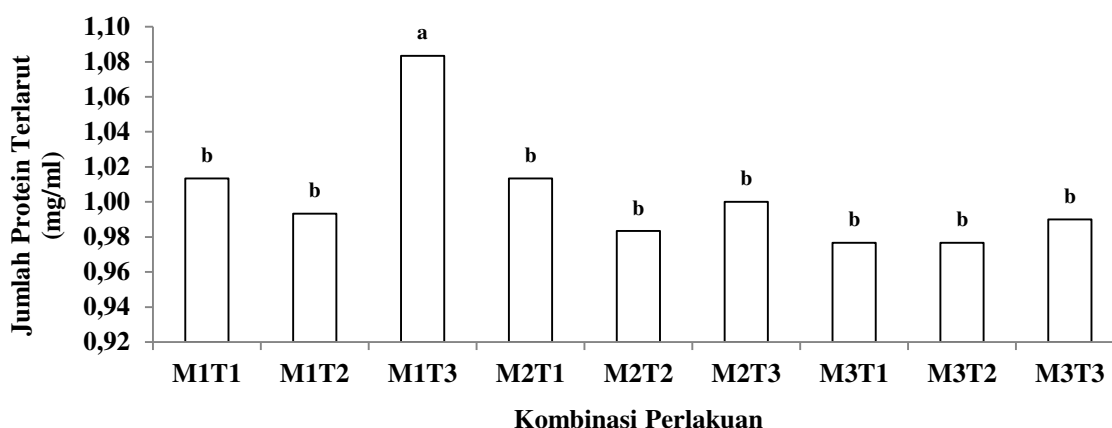
menunjukkan vibrasi C=O *stretching*. Muyonga *et al.* (2004) menyatakan bahwa amida I terdiri atas empat komponen struktur sekunder protein, yaitu  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn, dan *random coil* yang saling bertumpang tindih. Puncak wilayah serapan komponen  $\alpha$ -heliks ( $1654\text{ cm}^{-1}$  dan  $1658\text{ cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -sheet ( $1624\text{ cm}^{-1}$  dan  $1642\text{ cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -turn ( $1666\text{ cm}^{-1}$ ,  $1672\text{ cm}^{-1}$ ,  $1680\text{ cm}^{-1}$ ,  $1688\text{ cm}^{-1}$ ), dan *random coil* ( $1648\text{ cm}^{-1}$ ). Berdasarkan puncak serapan Amida I pada kolagen M1T3 menunjukkan bahwa kolagen memiliki struktur  $\beta$ -sheet sebagai komponen penyusun kolagen.

Spektra FTIR kolagen M1T3 memiliki bilangan gelombang  $1516,22\text{ cm}^{-1}$  (amida II) dan  $1339,01\text{ cm}^{-1}$  (amida III). Amida II dan amida III berada pada puncak wilayah serapan  $1480\text{--}1575\text{ cm}^{-1}$  dan  $1229\text{--}1301\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan interaksi intermolekuler pada kolagen dengan adanya gugus CN *stretching* dan NH *bending* (Kong and Yu, 2007). Kaewdang *et al.* (2014) juga menemukan amida II dan amida III pada puncak wilayah serapan  $1549\text{ cm}^{-1}$  dan  $1454\text{ cm}^{-1}$  (ASC) dengan rasio serapan mendekati nilai 1 antara amida III menunjukkan struktur *triple helix*. Intensitas amida III berkaitan

dengan struktur *triple helix* (Muyonga *et al.*, 2004). Kolagen yang terdenaturasi menjadi gelatin diindikasikan dengan hilangnya struktur *triple helix* akibat perubahan  $\alpha$ -heliks menjadi struktur *random coil* (*single heliks*), dan memiliki nilai bilangan gelombang pada kisaran  $1235\text{ cm}^{-1}$  (Nikko *et al.*, 2011). Hal ini berarti bahwa ekstraksi kolagen gelembung renang ikan cunang dengan asam asetat 0,25 M dan waktu perendaman 72 jam (M1T3) pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  belum terdegradasi menjadi bentuk gelatin.

### 3.2.4. Protein Terlarut dan Bobot Molekul

Hasil sidik ragam (ANOVA) protein terlarut kolagen gelembung renang ikan cunang menunjukkan bahwa interaksi (MT) berpengaruh sangat nyata ( $p>0,05$ ) dan hasil uji lanjut DMRT menunjukkan berbeda nyata pada perlakuan asam asetat 0,25 M dan waktu perendaman 72 jam (M1T3), yaitu memiliki rerata protein terlarut  $1,08\text{ mg/mL}$ . Gambar 5 menunjukkan rerata protein terlarut dari kolagen gelembung renang ikan cunang hasil ekstraksi asam asetat dengan lama waktu perendaman (MT).

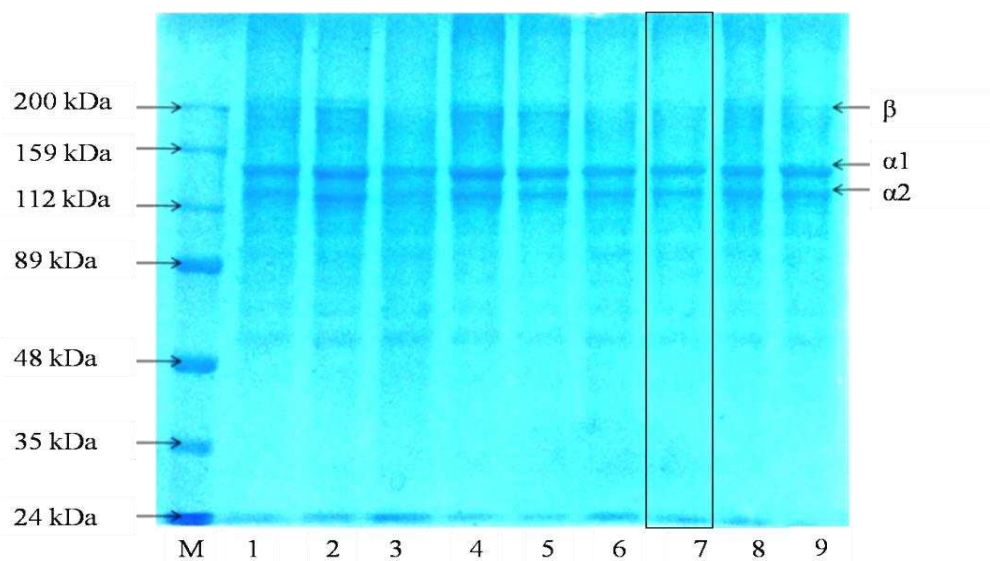


Gambar 5. Rerata protein terlarut dari kolagen gelembung renang ikan cunang hasil ekstraksi asam asetat dengan lama waktu peredaman. M1T1 = 0,25 M asam asetat selama 24 jam; M1T2 = 0,25 M asam asetat selama 48 jam; M1T3 = 0,25 M asam asetat selama 72 jam; M2T1 = 0,50 M asam asetat selama 24 jam; M2T2 = 0,50 M asam asetat selama 48 jam; M2T3 = 0,50 M asam asetat selama 72 jam; M3T1 = 0,75 M asam asetat selama 24 jam; M3T2 = 0,75 M asam asetat selama 48 jam; M3T3 = asam asetat selama 72 jam.

Kelarutan protein kolagen menunjukkan bahwa perlakuan MIT3 merupakan perlakuan terpilih. Menurut Wang *et al.* (2014), peningkatan kadar protein terlarut berkaitan dengan perubahan jumlah struktur ikatan asam amino yang menyusun protein kolagen. Jumlah protein terlarut yang tinggi menyebabkan kadar protein dalam kolagen juga cenderung meningkat.

Bobot molekul protein yang diukur menggunakan prinsip elektroforesis *Sodium Dodecyl Sulphate PolyacrilamideGel Electrophoresis* (SDS-PAGE) yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasi dan berat molekulnya dalam sebuah medan listrik (sifat *electrophoretic mobility*) (Rosenberg, 1996). Bobot molekul (BM) kolagen dengan ekstraksi asam asetat pada Gambar 6.

Bobot molekul (BM) protein kolagen dengan ekstraksi asam asetat pada semua perlakuan konsentrasi asam asetat dan lama waktu perendaman memiliki pita utama  $\alpha 1$  dan  $\alpha 2$  dengan BM masing-masing 136 kDa dan 117 kDa. Menurut Ogawa *et al.* (2004), keberadaan rantai  $\alpha$  menunjukkan bahwa kolagen tersebut merupakan kolagen tipe I. Kolagen tipe I merupakan kolagen bentuk dasar yang dapat ditemukan pada bagian tendon dan jaringan ikat lainnya. Demikian halnya dengan gambaran mikroskopik gelembung renang ikan cunang yang menunjukkan struktur jaringan ikat kolagen dengan dominan warna biru (Gambar 1b). Molekul kolagen tipe I mempunyai BM rata-rata 290 kDa dan mengandung 3 rantai polipeptida, masing-masing 94 kDa. Ketiga polipeptida ini diketahui sebagai rantai  $\alpha$ , yang masing-masing melingkari rantai lainnya seperti



Gambar 6. Pola pita protein kolagen larut asam gelembung renang ikan cunang. (M) Marker; (1) konsentrasi asam asetat 0,25 M dan waktu ekstraksi 24 jam (M1T1); (2) konsentrasi asam asetat 0,50 M dan waktu ekstraksi 24 jam (M2T1); (3) konsentrasi asam asetat 0,75 M dan waktu ekstraksi 24 jam (M3T1); (4) konsentrasi asam asetat 0,25 M dan waktu ekstraksi 48 jam (M1T2); (5) konsentrasi asam asetat 0,50 M dan waktu ekstraksi 48 jam (M2T2); (6) konsentrasi asam asetat 0,75 M dan waktu ekstraksi 48 jam (M3T2); (7) konsentrasi asam asetat 0,25 M dan waktu ekstraksi 72 jam (M1T3); (8) konsentrasi asam asetat 0,50 M dan waktu ekstraksi 72 jam (M2T3); dan (9) konsentrasi asam asetat 0,75 M dan waktu ekstraksi 72 jam (M3T3).

untaian tali sehingga mempunyai struktur *triple helix*. Hal inilah yang membuat molekul kaku dan bentuknya seperti batang (Shoulders and Raines, 2009).

Hasil penelitian menunjukkan kesesuaian dengan penelitian kolagen larut asam (ASC) dari hasil perairan lainnya, yaitu memiliki dua rantai alfa ( $\alpha 1$  dan  $\alpha 2$ ) dan rantai beta ( $\beta$ ) yang tergolong kolagen tipe I, seperti kolagen gelembung renang ikan *yellow fin* tuna (Kaewdang *et al.*, 2014); gelembung renang ikan *bighead carp* (Liu *et al.*, 2012); dan gelembung renang ikan kakap putih (Sinthusamran *et al.*, 2013).

Berdasarkan pengamatan secara visual terhadap kolagen yang dihasilkan dari gelembung renang ikan cunang, tidak ditemukan benda asing seperti kotoran dan benda asing lainnya, serta kolagen memiliki tekstur seperti serat kapas. Kolagen terpilih berdasarkan kelarutan, jumlah rendemen liofilisasi, gugus fungsi dan bobot molekul adalah kolagen M1T3, yaitu kolagen hasil ekstraksi asam asetat 0,25 molar dengan lama waktu ekstraksi 72 jam (3 hari).

### 3.2.5. Komposisi Proksimat, pH, Logam Berat, dan Mikrobiologi Kolagen

Berdasarkan analisis kelarutan, jumlah rendemen, dan hasil karakterisasi gugus fungsi, protein terlarut dan bobot molekul kolagen gelembung renang ikan cunang menunjukkan bahwa karaktersitik dari kolagen M1T3 adalah kolagen terpilih sebagai

perlakuan terbaik. Hasil analisis proksimat, pH, logam berat, dan mikrobiologi kolagen M1T3 disajikan pada Tabel 4.

Komposisi proksimat kolagen M1T3 menunjukkan kadar protein  $86,74 \pm 0,20\%$ bb yang merupakan komponen paling dominan dibandingkan dengan komponen lainnya, seperti kadar air  $12,12 \pm 0,04\%$ bb, kadar abu  $1,31 \pm 0,13\%$ bb, kadar lemak  $0,17 \pm 0,03\%$ bb, yaitu masih berada pada kisaran standar SNI (BSN, 2014). Kadar protein kolagen M1T3 lebih tinggi dibandingkan dengan protein kolagen dari daging teripang gamma (Alhana *et al.*, 2015) dan hampir sama dengan kolagen kulit ikan pari *Pastinachus solocirostris* (Nur'aenah, 2013). Rendahnya kadar lemak dan abu pada kolagen M1T3 menunjukkan keberhasilan dari proses pra ekstraksi gelembung renang ikan cunang dalam larutan basa (NaOH) cukup efektif untuk mengurangi lemak, mineral-mineral dan pengotor dalam gelembung renang ikan. Hal ini sejalan dengan pendapat Hinterwaldner (1977) bahwa penggunaan larutan basa mampu menghancurkan sebagian ikatan kovalen, peptida dan hidrogen pada struktur kolagen, sehingga mampu meluruhkan lemak, pigmen, kotoran dan protein non-kolagen. Kadar air dalam kolagen turut menentukan daya tahan dan penerimaan terhadap suatu bahan, sedangkan kadar abu juga turut menjadi penentu kandungan mineral dalam kolagen yang dihasilkan.

Tabel 4. Komposisi proksimat, pH, logam berat, dan mikrobiologi kolagen larut asam (ASC) dari gelembung renang ikan cunang (*Muarenesox talabon*).

Parameter Uji	Satuan	Kolagen Gelembung Renang <i>M. talabon</i> <sup>1</sup>	Syarat Mutu Kolagen
Air	%bb	12,12±0,04	≤ 12 (BSN 2014)
Protein	%bb	86,74±0,20	≥ 75 (BSN 2014)
Lemak	%bb	0,17±0,03	≤ 1 (BSN 2014)
Abu	mg/kg	1,31±0,13	≤ 1 (BSN 2014)
pH	-	4,31	6,5 – 8 (BSN 2014)
Pb	mg/kg	0,009*	≤ 0,4 (BSN 2014)
Hg	mg/kg	0,004*	≤ 0,5 (BSN 2014)

Parameter Uji	Satuan	Kolagen Gelembung Renang <i>M. talabon</i> <sup>1</sup>	Syarat Mutu Kolagen
As	mg/kg	0,008*	≤ 1 (BSN 2014)
Cd	mg/kg	0,00011*	≤ 0,1 (BSN 2014)
<i>E. coli</i>	/0,1 gram	0,000	< 3 (BSN 2014)
<i>Salmonella</i>	/10 gram	0,000	Negatif (BSN 2014)

Keterangan : <sup>1</sup>Data penelitian, rerata ± SD dari 3 ulangan pada sampel yang sama,  
\*limit deteksi *atomic absorption spectroscopy* (ASS).

Karakteristik kimia lainnya dari kolagen MIT3 adalah nilai pH yaitu 4,31 lebih rendah dibandingkan dengan ASC dari gelembung renang ikan *T. Albacares* (Kaewdang *et al.*, 2014). Kolagen MIT3 tergolong sebagai kolagen yang bersifat asam. Nilai pH kolagen penting diketahui karena berkaitan dengan tingkat kelarutan kolagen. Hal ini terjadi karena kolagen MIT3 merupakan kolagen yang diekstraksi menggunakan larutan asam asetat dan tidak dilakukan pengadukan saat proses dialisis. Menurut Dennison (2002) bahwa laju difusi ditentukan oleh konsentrasi molekul pelarut yang akan keluar dari kantung dialisis, luas permukaan kantung dialisis (membran) yang digunakan, volume pelarut, dan pengadukan dapat mempercepat laju transfer osmosis melewati membran.

Komponen logam berat juga ditentukan oleh kadar abu dari kolagen. Logam berat yang dianalisis pada kolagen MIT3, yaitu timbal (Pb), merkuri (Hg), arsen (As), dan kadmium (Cd) yaitu berada di bawah ambang batas kandungan logam berat pada sediaan kolagen (BSN, 2014). Hasil analisis mikrobiologi terhadap *E. coli* dan *Salmonella* juga negatif. Keseluruhan hasil analisis komponen kimia dan mikrobiologi kolagen larut asam dari gelembung renang ikan cunang (MIT3) menunjukkan bahwa kolagen yang dihasilkan sudah memenuhi standar sesuai dengan syarat mutu kolagen (BSN, 2014), hanya nilai pH yang masih belum memenuhi syarat mutu BSN (2014). Menurut spesifikasi *fish collagen powder* untuk kosmetik ditinjau dari komponen kimia, yaitu susut pengeringan <8%, total nitrogen (protein) >16%, pH 5,5-6,5, logam berat Pb

<10 ppm (mg/kg), As <1 ppm, dan mikrobiologi yaitu bakteri *coliform* <3 MPN/g (Thai Nippon RABJ Co., Ltd.).

### 3.2.6. Komposisi Asam Amino Kolagen

Komposisi asam amino berperan dalam menentukan stabilitas termal dari kolagen, karena setiap asam amino mempunyai karakteristik yang berbeda-beda. Komposisi asam amino kolagen larut asam gelembung renang ikan cunang (MIT3) yang dianalisis berdasarkan 17 standar disajikan pada Tabel 5.

Protein kolagen merupakan protein fibrosa yang mengandung 35% glisina dan sekitar 11% alanina serta kandungan prolina yang cukup tinggi (Van der Rest and Garrone, 1991). Menurut Katili (2009) bahwa kolagen mempunyai kekuatan rentang, struktur istimewa yang mengandung hidroksilisin dan hidroksiprolin, yakni asam-asam amino yang tidak terdapat dalam protein lain. Kolagen juga merupakan protein yang dapat menghasilkan gelatin, melalui proses pemanasan. Pemanasan pada suhu 40°C belum mengakibatkan putusannya ikatan kovalen yang ada pada kolagen, tetapi kolagen akan mengalami transformasi struktur dari bentuk untaian menjadi rusak secara permanen apabila suhu pemanasan naik menjadi 60°C atau lebih (Shoulders and Raines, 2009).

Kolagen MIT3 memiliki asam amino glisina 241,06 mg/g, prolina 88,73 mg/g, dan alanina 86,98 mg/g. Menurut Regenstein dan Zhou (2007) bahwa glisina merupakan asam amino yang mewakili hampir sepertiga dari total residu, dan itu didistribusikan secara merata di tiap residu ketiga dalam urutan

asam amino sebagai syarat dalam pembentuk struktur *triple helix* kolagen. Struktur *triple helix* kolagen dirakit dari polipeptida spesifik rantai  $\alpha$  dengan posisi Gly-X-Y, dimana posisi X diisi dengan asam amino prolina dan pada posisi Y diisi dengan asam amino hidroksiprolina atau juga hidroksilisina (Shoulders and Raines, 2009). Hidroksiprolina berasal dari prolina yang dikatalisis oleh enzim prolilin hidroksilase dan membutuhkan vitamin C sebagai kofaktornya, sedangkan hidroksilisina berasal dari hidroksilasi lisin oleh enzim lisil dan memerlukan vitamin C sebagai kofaktor (Van der Rest and Garrone, 1991). Asam amino prolina merupakan asam amino yang dapat menciptakan belokan pada struktur  $\alpha$ -heliks dan hidroksiprolina berfungsi dalam meningkatkan stabilitas kolagen (Voet *et al.*, 2013). Asam amino alanina, aspartat, glutamat, dan

serina merupakan asam amino yang dibentuk oleh transaminasi *oksoacid* yang sesuai. Keempat jenis asam amino ini berfungsi membentuk asam amino nonesensial lainnya (Ngili, 2009).

Kolagen M1T3 juga mengandung asam amino arginina yang cukup tinggi, yaitu 94,41 mg/g lebih tinggi dibandingkan dengan asam amino arginina pada kolagen gelembung renang ikan *T. albacares* yaitu 56 mg/g (Kaewdang *et al.*, 2014) dan kolagen gelembung renang ikan *L. calcarifer* yaitu 53 mg/g (Sinthusamran *et al.*, 2013). Asam amino arginina disintesis dari aspartat dan ornitin selama pembentukan urea (Ngili, 2009). Argininosuksinat sintetasa dan argininosuksinat liase mengkatalisis reaksi kondensasi dan pemotongan yang mengakibatkan pembentukan arginina. Asam glutamat pada kolagen M1T3 yaitu 67,25 mg/g

Tabel 5. Komponen asam amino kolagen gelembung renang ikan (mg/g).

Jenis Asam Amino	Kadar Asam Amino Gelembung Renang Ikan (mg/g)				
	<i>Muareneso x talabon</i> <sup>1</sup> (ASC)	<i>Congresox talabon</i> <sup>2</sup> (Hidroekstraksi)	<i>Muareneso x talabon</i> <sup>3</sup> (ASC)	<i>Thunnus albacares</i> <sup>4</sup> (ASC)	<i>Lates calcarifer</i> <sup>5</sup> (ASC)
Glisina ( <i>Gly</i> )	241,06	266,06	260,3	225	326
Prolina ( <i>Pro</i> )	88,73	108,96	100,5	80	111
Alanina ( <i>Ala</i> )	86,98	112,92	106,8	102	134
Asam glutamat ( <i>Glu</i> )	67,25	95,51	88,0	97	71
Asam aspartat ( <i>Asp</i> )	35,89	53,82	49,0	69	46
Arginina ( <i>Arg</i> )	94,41	125,84	85,8	56	53
Valina ( <i>Val</i> )	23,39	24,25	25,2	38	22
Isoleusina ( <i>Ile</i> )	10,00	9,33	11,3	25	9
Histidina ( <i>His</i> )	12,56	18,16	12,3	12	5
Treonina ( <i>Thr</i> )	29,75	34,08	35,4	42	24
Tirosina ( <i>Tyr</i> )	6,12	8,17	1,00	15	5
Fenilalanina ( <i>Phe</i> )	27,60	22,68	27,4	22	13
Serina ( <i>Ser</i> )	25,04	40,78	30,1	50	27
Lisina ( <i>Lys</i> )	28,89	37,91	37,5	44	25
Leusina ( <i>Leu</i> )	21,14	21,57	25,4	47	23
Sisteina ( <i>Cys</i> )	0,00	0,00	0,0	0	1
Metionina ( <i>Met</i> )	0,00	19,96	20,6	18	14

Keterangan : <sup>1</sup>Data penelitian, <sup>2</sup>Djailani *et al.* (2016), <sup>3</sup>Kartika dan Trilaksani (2016), <sup>4</sup>Kaewdang *et al.* (2014), <sup>5</sup>Sinthusamran *et al.* (2013).



lebih rendah dibandingkan dengan asam glutamat pada gelembung renang ikan cunang hasil hidroekstraksi dan ekstraksi asam, yaitu masing-masing 95,51 g/g dan 88,0 mg/g (Djailani *et al.*, 2016; Kartika dan Trilaksani, 2016).

Berdasarkan kandungan asam aminonya, kolagen M1T3 termasuk kolagen tipe 1. Menurut Nalinanon *et al.* (2011) bahwa kolagen dengan asam amino glisina, alanina, dan prolina yang tinggi, serta tirosina dan histidina yang rendah termasuk kolagen tipe 1. Hal ini dipertegas juga dengan hasil analisis gugus fungsi (FTIR) dan bobot molekul kolagen, yaitu memiliki gugus amida A, amida B, Amida I, amida II, dan amida III (Tabel 3) serta memiliki rantai  $\alpha 1$ , rantai  $\alpha 2$  (Gambar 6).

### 3.2.7. Stabilitas Termal (Differential Scanning Calorimetry/DSC) Kolagen

Stabilitas termal merupakan salah satu sifat kolagen yang berkaitan langsung dengan suhu denaturasi kolagen. Suhu denaturasi menunjukkan ketahanan kolagen terhadap perlakuan suhu tertentu. Hasil pengukuran DSC terhadap kolagen M1T3 pada rentang suhu 20°C-300°C dengan laju pemanasan 10°C/menit menunjukkan bahwa suhu puncak pelelehan 195,59°C ( $T_{max}$ ) dengan tinggi puncak 0,4878 mW, dan memiliki suhu awal pelelehan ( $T_{onset}$ ) 189,79°C dan suhu akhir pelelehan ( $T_{end}$ ) 203,17°C.

Kolagen gelembung renang ikan cunang (M1T3) menunjukkan suhu maksimal transisi ( $T_{max}$ ) kolagen yang tinggi, yaitu 195,59°C dengan  $\Delta H$  7,8113 J/g dibandingkan dengan kolagen gelembung renang ikan cunang hasil ekstraksi asam (ASC) dan hidrotermal, dengan nilai  $T_{max}$  ( $T_{transisi}$ ) masing-masing 103,37°C dan 101,70°C (Kartika dan Trilaksani, 2016). Benjakul *et al.* (2007) menyatakan bahwa komposisi asam amino juga turut berperan dalam menentukan stabilitas termal dari suatu bahan karena setiap asam amino

mempunyai karakteristik termal yang berbeda-beda dan akan secara simultan mempertahankan denaturasi apabila bahan diberikan kalor dari luar. Suhu transisi maksimal ( $T_{max}$ ) dari beberapa spesies memiliki perbedaan, seperti  $T_{max}$  dari ASC gelembung renang dan kulit ikan *L. calcarifer* adalah 35,02°C dengan  $\Delta H$  0,918 J/g dan 33,33°C dengan  $\Delta H$  0,860 J/g (Sinthusamran *et al.*, 2013),  $T_{max}$  dari ASC dan PSC gelembung renang ikan *T. albacares* adalah 32,97°C dengan  $\Delta H$  1,786 J/g dan 33,92°C dengan  $\Delta H$  0,354 J/g (Kaewdang *et al.*, 2014),  $T_{max}$  dari PSC gelembung renang ikan *Hypophthalmichthys nobilis* yaitu 37,3°C dengan  $\Delta H$  1,39 J/g (Liu *et al.*, 2012). Sinthusamran *et al.* (2013) menyatakan bahwa semakin tinggi nilai  $T_{max}$  dan  $\Delta H$  menunjukkan tingkat stabilitas termal yang tinggi. Perbedaan lingkungan hidup juga turut mempengaruhi kestabilan termal, yaitu kolagen dari spesies yang hidup di perairan dingin memiliki tingkat kestabilan termal rendah dibandingkan dengan kolagen dari spesies ikan yang hidup di perairan panas atau hangat. Stabilitas termal kolagen juga ditentukan oleh rantai *pyrrolidine* dari asam imino (prolina dan hidroksiprolina) dan sebagian oleh ikatan hidrogen melalui kelompok hidroksil dari hidroksiprolina (Benjakul *et al.*, 2010).

## IV. KESIMPULAN

Morfologi gelembung renang ikan cunang *M. talabon* memiliki tiga lapisan yaitu lapisan luar, tengah dan dalam yang tersusun atas serabut-serabut kolagen. Karakteristiknya mengandung protein yang tinggi dengan tiga komponen asam amino yang dominan (glisina, prolina, dan alanina). Kolagen terpilih (M1T3) memiliki rendemen liofilisasi 14,50% dengan karakteristik gugus fungsi dan bobot molekul yang tergolong kolagen tipe I, komposisi proksimat (kadar air, protein, lemak, abu), logam berat (Pb, Hg, As, Cd) dan cemaran mikrobiologi (*E. coli* dan *Salmonella*) yang sesuai dengan

syarat mutu kolagen, sedangkan nilai pH masih tergolong asam. Komponen asam amino kolagen M1T3 yang dominan (glisina, prolina, alalinina) dan kestabilan termal yang tinggi sehingga dapat diaplikasikan pada industri makanan, biomedis, farmaseutikal, dan kosmeseutikal.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Rektor dan Yayasan Universitas Kristen Artha Wacana (UKAW) Kupang yang telah mendanai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, M. and S. Benjakul. 2010. Extraction and characterization of pepsin soluble collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *J. Food Chemistry*, 120:817-824.
- Alhana, P. Suptijah, dan K. Tarman. 2015. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari daging teripang gamma (*Stichopus variegatus*). *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(2): 150-161.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 2005. Official methods of analysis. 18<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemist Inc. Mayland USA. 26p.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN). 2006a. Cara uji mikrobiologi-bagian 1: Penentuan *coliform* dan *Escherichia coli* pada produk perikanan: SNI 01-2332.1-2006. BSN. Jakarta. 23hlm.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN). 2006b. Cara uji mikrobiologi-bagian 2: Penentuan *Salmonella* pada produk perikanan: SNI 01-2332.2-2006. BSN. Jakarta. 25hlm.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN). 2009. Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan: SNI 7387:2009. BSN. Jakarta. 25hlm.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN). 2014. Kolagen kasar dari sisik ikan-syarat mutu dan pengolahan: SNI 8076-2014. BSN. Jakarta. 10hlm.
- Belbachir, K., R. Noreen, G. Gouspillou, and C. Petibois. 2009. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Analytical and Bio-analytical Chemistry*, 200:1-10. doi: 10.1007/s00216-009-3019-y.
- Benjakul, S., Y. Thiansilakul, W. Visessanguan, S. Roytrakul, H. Kishimura, T. Prodpran, and J. Meesane. 2010. Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. *J. Science Food Agriculture*, 90:132-138.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Budrugaec, P., E. Badea, G.D. Gatta, L. Miu, and A. Comanescu. 2010. A DSC study deterioration caused environmental chemical pollutants to parchment, a collagen-based material. *J. Thermochemica Acta*, 500:51-62.
- Coates, J. 2006. Interpretation of infrared spectra a practical approach. In: John Miley and Sons. (ed.). Encyclopedia of Analytical Chemistry. 1-23pp.
- Dennison, C. 2002. A guide to protein isolation. Kluwer Academic Publishers. New York. 186p.
- Dinas Kelautan dan Perikanan. 2014. Potensi produksi ikan cunang (*Muarenesox talabon*). Dinas Kelautan dan Perikanan Kabupaten Indramayu, Jawa Barat. Indramayu. 255hlm.
- Djailani, F., W. Trilaksani, dan T. Nurhayati. 2016. Optimasi ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari gelembung renang ikan cunang dengan metode asam-hidro-ekstraksi. *J. Pengolahan*

- Hasil Perikanan Indonesia*, 19(2): 156-167.
- Food Agricultural Organization (FAO). 1974. Species identification sheets. Fishing areas 57,71E Ind. Ocean, W. Cent. Pacific. 3p.
- Hinterwaldner, R. 1977. Raw material. In: Ward A.G. and Courts A. (ed.). *The Science and Technology of Gelatin*. Academic Press. New York (US). 295-314pp.
- Holma, K. Ayinsa, and B.K. Maalekuu. 2013. Effect of traditional fish processing methods on the proximate composition of red fish stored under ambient room conditions. *American J. of Food Nutrition*, 3(3):73-82.
- Jamilah, B., M.R. Umi Hartina, D. Mat Hashim, and A.Q. Sazili. 2013. Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research J.*, 20(2): 835-842.
- Jonsson, A. and J.R. Vidarsson. 2016. By products from whitefish processing. Skyrsla Matis. USA. 36p.
- Katilli, A.S. 2009. Struktur dan fungsi protein kolagen. *J. Pelangi Ilmu*, 2(5):10-29.
- Kaewdang, O., S. Benjakul, T. Kaewmanee, and H. Kishimura. 2014. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellow fin tuna (*Thunnus albacares*). *J. Food Chemistry*, 155:264-270.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP). 2014. Kelautan dan Perikanan dalam Angka Tahun 2015. Pusat Data Statistik dan Informasi KKP. Jakarta. 305hlm.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP). 2015. Laporan kinerja satu tahun kementerian kelautan dan perikanan, KKP. Jakarta. 98hlm.
- Kartika, I.W.D. and W. Trilaksani. 2016. Karakterisasi kolagen dari limbah gelembung renang ikan cunang hasil ekstraksi asam dan hidrotermal. *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 19(3):222-232.
- Kiernan, J.A. 1990. Histological and histochemical methods: theory and practice. 4<sup>th</sup> ed. Pergamon Press. Oxford, Inggris. 344p.
- Kittiphattanabawon, P. and S. Benjakul. 2010. Isolation and properties of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *Eur Food Res Technol*, 230:475-483.
- Kong, J. and S. Yu. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*, 39(8):549-559.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. Doi:10.1038/227680a0.
- Liu, D., L. Liang, J.M. Regenstein, and P. Zhou. 2012. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *J. Food Chemistry*, 133:1441-1448.
- Liu, D., X. Zhang, T. Li, H. Yang, H. Zhang, J.M. Regenstein, and P. Zhou. 2015. Extraction and characterization of acid and pepsin soluble collagens from the scales, skins and swim bladders of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *J. Food Bioscience*, 9:68-74.
- Mattjik, A.A. dan I.M. Sumertajaya. 2013. Perancangan percobaan dengan aplikasi SAS dan minitab. Ed ke-2. Institut Pertanian Bogor (IPB) Press. Bogor. 172hlm.
- Muyonga, J.H., C.G.B. Cole, K.G. Duodu. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *J. Food Chemistry*, 86:325-332.

- Nalinanon, S., S. Benjakul, W. Visessanguan, and H. Kishimura. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper *Priacanthus tayenus*. *J. Food Chemistry*, 104:593–601.
- Ngili, Y. 2009. Biokimia metabolisme dan bioenergetika. Ed ke-1. Graha Ilmu. Yogyakarta. 328hlm.
- Nollet, L.M.L. 1996. Handbook of Food Analysis: Physical characterization and nutrient analysis. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press LLC. New York. 2041p.
- Nur'aenah, N. 2013. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dan nanopartikel kolagen dari kulit ikan pari (*Pastinachus solocirostris*) sebagai bahan baku kosmetik. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 79hlm.
- Ogawa, M., R.J. Portier, M.W. Moody, J. Bell, M.A. Schexnayder, and J.N. Losso. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonias cromis*) and sheepshead seabream *Archosargus probatocephalus*. *J. Food Chemistry*, 88:495–501.
- Putra, A.B.N., L. Sahubawa, dan N. Ekantri. 2013. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan nila hitam *Oreochromis niloticus*. *J. Pascapenatan dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 8(2):171–180.
- Regenstein, J.M., M.M. Chaudry, and C.E. Regenstein. 2003. The kosher and halal food laws. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:111–117.
- Rosenberg, I.M. 1996. Protein analysis and purification. 2<sup>nd</sup> ed. Springer Science. Boston (US). 384p.
- Riyanto, B. 2006. Pengembangan pelapis edible dari isinglass dan aplikasinya untuk mempertahankan mutu udang masak. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 77hlm.
- Sinthusamran, S., S. Benjakul, and H. Kishimura. 2013. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *J. Food Chemistry*, 138:2435–2441.
- Shoulders M.D. and R.T. Raines. 2009. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78:929–958. Doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
- Trilaksani, W., Nurjanah, dan H. W. Utama. 2006. Pemanfaatan gelembung renang ikan patin *Pangasius hypophthalmus*. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*, 9(1):12–25.
- Trilaksani, W., R. Bambang, dan N. Rimadanti. 2008. Karakteristik edible film dari isinglass dengan penambahan sorbitol sebagai plasticizer. *J. Perikanan dan Kelautan*, 13(1):52–63.
- Van der, R.M. and R. Garrone. 1991. Collagen family of proteins. *J. FASEB*, 5:2814–2823.
- Voet, D., J.G. Voet, and C.W. Pratt. 2013. Principles of biochemistry, international student version. 4<sup>th</sup> ed. John Wiley and Sons, Inc. Singapor. 105p.
- Wang, L., X. An, F. Yang, Z. Xin, L. Zhao, and Q. Hu. 2008. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mantella*). *J. Food Chemistry*, 108:616–623.
- Wang, L., Q. Liang, T. Chen, Z. Wang, J. Xu, and H. Ma. 2014. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*. *J. Food Hydrocolloids*, 38:104–109.
- Zhou, P. and J.M. Regenstein. 2005. Effects of alkaline and acid pre-treatments on Alaska Pollock skin gelatin extraction. *J. of Food Science*, 70(6):392–396.
- Diterima : 29 April 2017  
Direview : 25 Mei 2017  
Disetujui : 30 November 2017

